



**MEDICAMENT-ENCAPSULATED MULTILAYER-STRUCTURED MICROPARTICLE****Publication number:** JP2004307398**Publication date:** 2004-11-04**Inventor:** IKOMA TOSHIYUKI; TANAKA JUNZO; MIZUSHIMA YUTAKA**Applicant:** NAT INST FOR MATERIALS SCIENCE; LTT BIO PHARMA CO LTD**Classification:**

**- international:** A61K9/50; A61K9/54; A61K31/573; A61K31/7088; A61K31/726; A61K38/00; A61K38/04; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/28; A61K38/43; A61K39/00; A61K39/395; A61K45/00; A61K47/04; A61K47/36; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P43/00; A61K9/50; A61K9/52; A61K31/57; A61K31/7088; A61K31/726; A61K38/00; A61K38/04; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/28; A61K38/43; A61K39/00; A61K39/395; A61K45/00; A61K47/02; A61K47/36; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K47/04; A61K9/54; A61K31/573; A61K38/00; A61K38/04; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/28; A61K38/43; A61K39/00; A61K39/395; A61K45/00; A61K47/36; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P43/00

**- european:** A61K9/50K; A61K31/7088; A61K31/726

**Application number:** JP20030103215 20030407**Priority number(s):** JP20030103215 20030407**Also published as:**

 WO2004089417 (A1)  
 WO2004089417 (A1)

**BEST AVAILABLE COPY****Report a data error here****Abstract of JP2004307398**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide medicament-encapsulated microparticles excellent in solubility/sustained-release effect in vivo.

**SOLUTION:** The medicament-encapsulated multilayer-structured microparticles are such ones as to be encapsulated with a biologically active substance, and such ones that the surfaces of calcium carbonate-based compound microparticles are coated with a calcium phosphate-based porous material and/or a biopolymer, wherein the calcium carbonate-based compound contains one or more kinds of metal ions selected from zinc ion, magnesium ion, iron ion and copper ion.

**COPYRIGHT:** (C)2005,JPO&NCIPI

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-307398

(P2004-307398A)

(43) 公開日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/04

A 6 1 K 47/04

4 C 0 7 6

A 6 1 K 9/54

A 6 1 K 9/54

4 C 0 8 4

A 6 1 K 31/573

A 6 1 K 31/573

4 C 0 8 5

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 39/00

4 C 0 8 6

A 6 1 K 38/04

A 6 1 K 39/395

D

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-103215 (P2003-103215)

(22) 出願日

平成15年4月7日(2003.4.7)

(71) 出願人 301023238

独立行政法人物質・材料研究機構  
茨城県つくば市千現一丁目2番1号

(71) 出願人 303010452

株式会社L T T バイオファーマ  
東京都港区愛宕2丁目5番1号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100112346

弁理士 内藤 由美

(72) 発明者 生駒 俊之

茨城県つくば市千現1-14-5-B20  
1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物封入多層構造微粒子

(57) 【要約】

【課題】生体内での溶解性・徐放効果に優れた薬物封入微粒子を提供する。

【解決手段】生物学的活性物質を封入してなり、亜鉛・マグネシウム・鉄および銅から選択される1種または2種以上の金属のイオンを含有する炭酸カルシウム系化合物微粒子の表面にリン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子を被覆した薬物封入多層構造微粒子を提供する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

生物学的活性物質を封入してなる炭酸カルシウム系化合物微粒子の表面にリン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子を被覆したことを特徴とする、薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項2】**

炭酸カルシウム系化合物が、亜鉛・マグネシウム・鉄および銅から選択される1種または2種以上の金属のイオンを含有するものである、請求項1記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項3】**

カルシウムに対して金属イオンが0.001～10重量%の範囲で置換した、請求項2記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項4】**

直径が0.1～200 $\mu$ mの範囲である、請求項1～3のいずれか1項記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項5】**

生物学的活性物質を微粒子に対して0.0001～10重量%含有する、請求項1～4のいずれか1項記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項6】**

生物学的活性物質が核酸、薬効を有するタンパク質または低分子化合物である、請求項1～5のいずれか1項記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項7】**

薬効を有するタンパク質が、エリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、トロポポエチン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、インターロイキン-11(IL-11)、抗TNF- $\alpha$ 抗体、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、レプチン、ニュートロフィン-3(NT-3)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、インスリン、ヒト成長ホルモン、抗体および抗原からなる群から選択される1種または2種以上であることを特徴とする請求項6記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項8】**

薬効を有する低分子化合物が、ステロイドホルモン、抗炎症薬、抗微生物薬、抗ガン薬、血管作動薬、抗動脈硬化薬、免疫抑制薬、カルシトニン、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)誘導体、脳下垂体ペプチドホルモン、バイコマイシン、ティコプラニン、及び副甲状腺ホルモン(PTH)からなる群から選択される1種または2種以上であることを特徴とする請求項6記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項9】**

生体高分子がグリコサミノグリカンである請求項1～8のいずれか1項記載の薬物封入多層構造微粒子。

**【請求項10】**

以下の工程：

- (1) カルシウム塩水溶液を準備し、
- (2) この溶液に生物学的活性物質を添加混合し、
- (3) 亜鉛・マグネシウム・鉄および銅から選択される1種または2種以上の金属の塩を添加混合し、
- (4) 炭酸塩または炭酸塩を含む化合物を添加混合することにより生物学的活性物質を炭酸カルシウム系化合物微粒子に封入せしめ、そして
- (5) 該炭酸カルシウム系化合物微粒子にリン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子を被覆する、

ことを含む、薬物封入多層構造微粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物学的活性物質、具体的には薬効をもつタンパク質及び／または低分子化合物を封入させた炭酸カルシウム系化合物微粒子をリン酸カルシウム系無機物微粒子及び／または生体高分子により被覆させた薬物封入多層構造微粒子に関する。

【0002】

【従来の技術】

カルシウム含有無機物質を薬剤の担体として用いた技術として、水酸アパタイト微結晶の表面に抗癌薬等を担持させた製剤、アパタイト多孔体を用いた徐放製剤が知られている。また、炭酸カルシウムを用いた点鼻薬が記載されている（特許文献1及び2を参照）。また、炭酸カルシウム表面にアパタイトを被覆させる方法に関してはこれまでに報告がある（例えば特許文献3～5を参照）。また、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、シュウ酸カルシウム、尿酸カルシウム等のカルシウム含有水難溶性無機物に基づく薬剤封入無機物微粒子に関しては、特許文献6が出願されている。

【0003】

【特許文献1】

特開平07-165613号公報

【特許文献2】

特開平08-027031号公報

【特許文献3】

特開平7-118011号公報

【特許文献4】

特開平8-12527号公報

【特許文献5】

特開平11-180705号公報

【特許文献6】

特開2002-348234号公報

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

これまでに報告されている炭酸カルシウム表面にアパタイトを被覆させる技術では薬物が失活してしまう問題があった。また、特開2002-348234号に記載の技術は、生体内での溶解性・徐放効果において十分でない。

【0005】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者らは、炭酸カルシウム系化合物微粒子にリン酸カルシウム系無機微粒子及び／または生体高分子を被覆させた多層構造を持った複合材料の開発を行った。多層構造体は、カルシウム系無機物微粒子中に薬剤を封入させた後に、リン酸カルシウム系無機物微粒子及び／または生体高分子により被覆させる。本方法により得られた薬物封入多層構造微粒子は、徐放製剤として使用できるものである。

【0006】

すなわち、本発明は、以下の(1)～(10)を提供する。

(1) 生物学的活性物質を封入してなる炭酸カルシウム系化合物微粒子の表面にリン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子を被覆したことを特徴とする、薬物封入多層構造微粒子。

(2) 炭酸カルシウム系化合物が、亜鉛・マグネシウム・鉄および銅から選択される1種または2種以上の金属のイオンを含有するものである、上記(1)記載の薬物封入多層構造微粒子。

(3) カルシウムに対して金属イオンが0.001～10重量%の範囲で置換した、

上記(2)に記載の薬物封入多層構造微粒子。

(4) 直径が0.1~200 $\mu$ mの範囲である、上記(1)~(3)のいずれか記載の薬物封入多層構造微粒子。

(5) 生物学的活性物質を微粒子に対して0.0001~10重量%含有する、上記(1)~(4)のいずれか記載の薬物封入多層構造微粒子。

(6) 生物学的活性物質が核酸、薬効を有するタンパク質または低分子化合物である、上記(1)~(5)のいずれか記載の薬物封入多層構造微粒子。

(7) 薬効を有するタンパク質が、エリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、トロンボポエチン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、インターロイキン-11(IL-11)、抗TNF- $\alpha$ 抗体、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、レプチン、ニュートロフィン-3(NT-3)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、インスリン、ヒト成長ホルモン、抗体および抗原からなる群から選択される1種または2種以上であることを特徴とする上記(6)記載の薬物封入多層構造微粒子。

(8) 薬効を有する低分子化合物が、ステロイドホルモン、抗炎症薬、抗微生物薬、抗ガン薬、血管作動薬、抗動脈硬化薬、免疫抑制薬、カルシトニン、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)誘導体、脳下垂体ペプチドホルモン、バシコマイシン、ティコプラニン、及び副甲状腺ホルモン(PTH)からなる群から選択される1種または2種以上であることを特徴とする上記(6)記載の薬物封入多層構造微粒子。

(9) 生体高分子がグリコサミノグリカンである上記(1)~(8)のいずれか記載の薬物封入多層構造微粒子。

(10) 以下の工程：

(i) カルシウム塩水溶液を準備し、

(ii) この溶液に生物学的活性物質を添加混合し、

(iii) 亜鉛・マグネシウム・鉄および銅から選択される1種または2種以上の金属の塩を添加混合し、

(iv) 炭酸塩または炭酸塩を含む化合物を添加混合することにより生物学的活性物質を炭酸カルシウム系化合物微粒子に封入せしめ、そして

(v) 該炭酸カルシウム系化合物微粒子にリン酸カルシウム系多孔質材料及び/または生体高分子を被覆する、

ことを含む、薬物封入多層構造微粒子の製造方法。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明において使用される炭酸カルシウム系化合物は、炭酸カルシウム、及び炭酸カルシウムを主成分とし、カルシウムに対して金属イオンが0.001~10重量%の範囲で置換しているものを含む。特開2002-348234号では、炭酸カルシウムの他に、リン酸カルシウム、シュウ酸カルシウム、尿酸カルシウム等のカルシウム含有水難溶性無機物に基いて薬物封入微粒子を作製しているが、本発明においては、炭酸カルシウムが特異的に薬物を封入できるという理由から、炭酸カルシウムを用いる。本発明で用いる微粒子は、構造的には1~100nmの大きさの炭酸カルシウム微結晶が集合した形態をとるものであり、その集合体の内部に下記の生物学的活性物質が封入されている。炭酸カルシウムの結晶形態は特に限定するものではないが、バテライトを使用した場合は、リン酸カルシウム系無機物微粒子及び/または生体高分子を被覆する際に溶解する場合があることから、カルサイトであることが好ましい。微結晶集合体としての微粒子の直径は、200 $\mu$ mを超えると注射が困難になること等から、好ましくは0.1~200 $\mu$ mである。

【0008】

炭酸カルシウム結晶中に他の金属イオンが混入したものは従来より知られているが、本発明者等は、意外なことに、多層構造微粒子の作製のためには、金属イオンが微量でも混在

することが特に好適であることを見出した。金属イオンとしては、生体高分子との親和性及び生体内における毒性等を考慮して、亜鉛、マグネシウム、鉄、銅等が挙げられる。金属イオンの含有率が0.001重量%未満であると、リン酸カルシウム系無機物微粒子及び/または生体高分子の被覆がやや困難となり、10重量%を超えると生体毒性を示す可能性がある。

#### 【0009】

本発明の微粒子は、生物学的活性物質を内部に封入してなることを一つの特徴とする。ここで、「封入」とは、微粒子内部の微結晶表面に生物学的活性物質が配位結合、ファンデルワールス力、イオン結合または共有結合で吸着していること、あるいは内包されていることをいい、結合の様式は封入する薬物によって異なる。生物学的活性物質が封入されているか否かは、例えば酸性溶液で薬物封入炭酸カルシウムを溶解させ、化学分析すること、または凍結乾燥後に熱分解による発熱が観測されることによって確認することができる。本発明の微粒子は、生物学的活性物質を微粒子に対して0.0001~10重量%含有することが好ましい。

#### 【0010】

生物学的活性物質としては、具体的には核酸、薬効を有するタンパク質及び低分子化合物が挙げられる。

核酸としては、DNA、RNA及びその断片が挙げられ、天然のものであっても合成のものであっても良く、機能を有するタンパク質をコードする遺伝子の他に、アンチセンス核酸、リボザイム等の機能を有するものが含まれる。

#### 【0011】

薬効を有するタンパク質としては、特に限定するものではないが、例えばエリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、トロンボポエチン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、インターロイキン-11(IL-11)、抗TNF- $\alpha$ 抗体(例えば商標名エンブレル(Embreli)としてImmunex corporationから販売されている)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、レプチン、ニュートロフィン-3(NT-3)、スーパーオキシジスムターゼ(SOD)、インスリン、ヒト成長ホルモン、抗体および抗原等が挙げられる。

#### 【0012】

薬効を有する低分子化合物としては、特に限定するものではないが、例えば非炎症性ステロイドホルモン、ヒドロコルチゾン類などの抗炎症薬、抗微生物薬、抗ガン薬、プロスタグランジンなどの血管作動薬、抗動脈硬化薬、免疫抑制薬、カルシトニン、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)誘導体、他の脳下垂体ペプチドホルモン、バイコマイシン、ティコプラニン、副甲状腺ホルモン(PTH)等が挙げられる。

#### 【0013】

本発明の薬物封入多層構造微粒子は、上記構成の炭酸カルシウム系化合物微粒子の表面にリン酸カルシウム系多孔質材料及び/または生体高分子を被覆したことを特徴とするものである。本明細書において、リン酸カルシウム系多孔質材料としては、アパタイト、ハイドロキシアパタイト、炭酸含有アパタイト等が挙げられる。

#### 【0014】

リン酸カルシウム系多孔質材料は炭酸カルシウム系化合物材料と比較して溶解度が低いことが知られており、そのため、リン酸カルシウム系多孔質材料を被覆した本発明の多層構造微粒子は、最初に核である炭酸カルシウムが溶解し、多孔質であるリン酸カルシウム系材料の多孔部分から薬を徐放すると考えられる。

#### 【0015】

リン酸カルシウム系多孔質材料で被覆する最大の利点は生体親和性である。例えば炭酸カルシウム単独で筋肉中に移植すると、その周りを繊維系組織が覆ってしまい(器質化)、

薬物が徐放されなくなるのに対し、リン酸カルシウムで被覆すると器質化が生じないことが考えられる。

【0016】

本明細書において、生体高分子とは、生体内に天然で存在し得る高分子をいい、例えばコラーゲン等のタンパク質、グリコサミノグリカン等の多糖類等が挙げられる。

【0017】

グリコサミノグリカンとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸等が挙げられ、本発明においては好ましくは分子量が10,000~1,000,000のものを使用する。分子量が小さすぎる場合には、薬物の徐放制御が困難であったり、十分な被覆が不可能となる場合があり、分子量が大きすぎるとその粘性が高くなり、注射等に不向きである。

【0018】

リン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子による被覆は、上記生物学的活性物質が失活しない条件下で行うようにすることが必要である。具体的にはこれらと炭酸カルシウム系化合物微粒子とを水溶液中で共存させることによって容易に行うことができる。被覆すべき炭酸カルシウム系化合物微粒子に対して、使用するリン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子の量は、それぞれ1:0.01~1:0.2の範囲とするのが好ましい。

【0019】

本発明において、リン酸カルシウム系多孔質材料及び／または生体高分子による被覆率は、好ましくは炭酸カルシウム系化合物微粒子表面の10~100%である。50%以上被覆されている場合には、生体親和性の向上及び生体内での徐放効果が達成される。被覆率は、熱分析による重量減少及び粉末X線回折測定によって確認することができる。

【0020】

本発明の薬物封入多層構造微粒子は、製薬上許容し得る添加剤、例えばヒト血清アルブミン(HSA)等のタンパク質、界面活性剤、分散剤、安定化剤、防腐剤等を添加し、これをそのまま製剤とするか、あるいは乾燥または凍結乾燥して製剤とすることができる。乾燥製剤は使用時に水または緩衝溶液等に懸濁して皮下注射、筋肉内注射、血管内注射等の注射剤として、あるいは経鼻等の経粘膜投与剤として用いることができる。

【0021】

【実施例】

〔実施例1〕

5mol/lの塩化カルシウム0.65mlに精製水3.35mlを加え、さらに塩化マグネシウム0.661gを添加して攪拌後、5%リン酸ヒドロコルチゾン0.375mlを混和させた。この溶液に1mol/lの炭酸ナトリウム2.5mlを加えて攪拌を行った。比較対照として、塩化マグネシウムを加えず、同様の操作を行った。得られた各懸濁液を遠心分離(22000rpm)後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。尚、製剤化のためには、薬物を失活させずに粉末にするために凍結乾燥工程が必須となる。得られた各試料をX線回折測定・赤外線スペクトル・走査型電子顕微鏡観察・熱分析を行った。

【0022】

その結果、塩化マグネシウムを加えた系ではカルサイト単相が、加えない系ではバテライト単相が確認された。熱分析により各試料ともに450度までに7.5重量%の重量減少と発熱が観察された。炭酸ガスとして出てきた重量減少から炭酸カルシウムの含有量を計算し、更に200度から600度までの発熱を伴う重量減量を薬物の含有量として計算することにより、薬物の封入率が100%に近いことが分かった。走査型電子顕微鏡観察により、塩化マグネシウムを加えた系では1μm以下の球形状の粒子が観察され(図1)、塩化マグネシウムを加えない系では1~3μmの球形状の粒子が観察された。(図2)

【0023】

〔実施例2〕

実施例1により得られたマグネシウム含有炭酸カルシウムのマグネシウム置換率をX線回

折測定による格子定数とRietveld解析による席占有率解析から算出した。カルサイトの格子定数は、 $a=0.499$ 、 $c=1.706\text{ nm}$ であり、合成したマグネシウム含有カルサイトの格子定数は $a=0.494$ 、 $c=1.685\text{ nm}$ であった。またRietveld解析の席占有率解析より、合成した組成は $\text{Ca}_{0.87}\text{Mg}_{0.13}\text{CO}_3$ であった。

【0024】

〔実施例3〕

実施例1で合成した粒子の断面を透過型電子顕微鏡にて観察した。いずれの試料も粒子の中心から放射状に結晶が配向していた。また、粒子を碎き透過型電子顕微鏡で観察した結果、マグネシウムを含む試料にはカルサイト特有の自形を呈した $5\text{ nm}$ の微結晶（カルサイト；図3）が、マグネシウムを含まない試料には無定形を呈した $10\text{ nm}$ 程度の微結晶（バテライト；図4）が観測された。

【0025】

〔実施例4〕

実施例1で合成した粒子を用いて、リン酸カルシウムの被覆を行った。カルシウムとリン酸水素イオンをそれぞれ $2.5\text{ mmol/l}$ 及び $1.0\text{ mmol/l}$ 含む、 $\text{pH}8.0$ （トリス塩酸バッファーにて調整）の溶液 $40\text{ ml}$ 中に薬物封入炭酸カルシウムを $10\text{ mg}$ 加え、3時間・ $37^\circ\text{C}$ で浸漬させた。得られた懸濁液は遠心分離（ $22000\text{ rpm}$ ）後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。各粉末試料に対して赤外線スペクトル分析を行った。

【0026】

その結果、マグネシウムを含む系では、リン酸カルシウムのリン酸基に対応する $1000\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収が観測され、また、カルサイトに特有な $720\text{ cm}^{-1}$ の吸収が観測された。マグネシウムを含まない系では、バテライトが溶解してしまうために、リン酸カルシウムの吸収しか観測されなかった。これより、マグネシウムを含む系ではリン酸カルシウムの被覆が可能であることが分かった。

【0027】

〔実施例5〕

$5\text{ mol/l}$ の塩化カルシウム $0.65\text{ ml}$ に精製水を加え、 $0.1\text{ mol/l}$ の塩化亜鉛 $3.25\text{ ml}$ （ $\text{pH}5.0$ に塩酸で調整）を添加する。さらに $5\%$ リン酸ヒドロコルチゾン $0.375\text{ ml}$ を加え、精製水 $0.1\text{ ml}$ を加えた。この溶液に $1\text{ mol/l}$ の炭酸ナトリウム $2.5\text{ ml}$ を加えて攪拌することで薬物封入炭酸カルシウムの合成を行った。得られた各懸濁液を遠心分離（ $22000\text{ rpm}$ ）後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。得られた各試料について、X線回折測定・赤外線スペクトル・走査型電子顕微鏡観察・熱分析を行った。

【0028】

その結果、塩化亜鉛を加えた系ではカルサイト単相が確認された。熱分析により $450^\circ\text{C}$ までに $7.5\%$ 重量%の重量減少と発熱が観察され、薬物の封入率が $100\%$ に近いことが分かった。走査型電子顕微鏡観察により、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の球形状の粒子が観察された。

【0029】

〔実施例6〕

実施例5により得られた亜鉛含有炭酸カルシウムの亜鉛置換率をX線回折測定による格子定数とRietveld解析による席占有率解析から算出した。カルサイトの格子定数は、 $a=0.499$ 、 $c=1.706\text{ nm}$ であり、合成した亜鉛含有カルサイトの格子定数は $a=0.498$ 、 $c=1.700\text{ nm}$ であった。またRietveld解析の席占有率解析より、合成した組成は $\text{Ca}_{0.96}\text{Zn}_{0.04}\text{CO}_3$ であった。

【0030】

〔実施例7〕

実施例5で合成した亜鉛含有炭酸カルシウム微粒子を用いて、リン酸カルシウムの被覆を行った。カルシウムとリン酸水素イオンをそれぞれ $2.5\text{ mmol/l}$ 及び $1.0\text{ mmol/l}$ 含む、 $\text{pH}8.0$ （トリス塩酸バッファーにて調整）の溶液 $40\text{ ml}$ 中に薬物封入炭酸カルシウムを $10\text{ mg}$ 加え、3時間・ $37^\circ\text{C}$ で浸漬させた。得られた懸濁液は遠心分離（ $22000\text{ rpm}$ ）後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。各粉末試料に対して赤外線スペクトル分析を行った。



1/1含む、pH8.0(トリス-塩酸バッファーにて調整)の溶液40ml中に薬物封入炭酸カルシウムを10mg加え、3時間・37度で浸漬させた。得られた懸濁液は遠心分離(22000rpm)後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。得られた試料に対して赤外線スペクトル分析を行った。

#### 【0031】

その結果、リン酸カルシウムのリン酸基に対応する $1000\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収が観測され、また、カルサイトに特有な $720\text{ cm}^{-1}$ の吸収が観測された。これより、薬物封入炭酸カルシウムの表面にリン酸カルシウムが被覆されていることが分かった。また、走査型電子顕微鏡による観察から、完全に被覆されていることが確認された。

#### 【0032】

##### 【実施例8】

実施例5により合成した亜鉛含有炭酸カルシウム微粒子を用いて、生体高分子コンドロイチン硫酸の被覆を行った。10mlの精製水に30mgの生体高分子を添加して、200mgの亜鉛含有薬物封入炭酸カルシウムを浸漬した。遠心分離(22000g)後、上澄みを除いて凍結乾燥を行った。赤外線スペクトル分析・熱分析により被覆に関して検討した。赤外線スペクトル分析により、 $1200\sim1400\text{ cm}^{-1}$ の範囲に $\text{SO}_3^-$ 基による吸収が観測された。これより、生体高分子が表面に被覆されていることが分かった。

#### 【0033】

##### 【発明の効果】

従来、炭酸カルシウムは、核形成・結晶成長のモデル系として研究されてきたが、生体材料としての利用価値は低かった。本発明は、生体高分子及び/またはリン酸カルシウムを金属イオン含有薬物封入炭酸カルシウム表面に被覆させた新規な多層構造を開発し、生体親和性の向上・生体内での徐放効果の最適化を行った。このような多層構造体はこれまでに報告されていない方法により開発したものであり、徐放製剤・細胞足場材用の新しい材料素材として有望であり、新規なDDSキャリアー・無機/有機複合材料の産業育成につながることを期待される。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】マグネシウム含有薬物封入炭酸カルシウム微粒子の走査型電子顕微鏡像を示す。粒子径 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子が観測される。

【図2】マグネシウムを含まない薬物封入炭酸カルシウム微粒子の走査型電子顕微鏡像を示す。粒子径 $1\sim3\mu\text{m}$ 程度の球形粒子が観測される。

【図3】マグネシウム含有炭酸カルシウム微粒子の透過型電子顕微鏡像を示す。粒子径5nm程度の粒子が観測される。

【図4】マグネシウムを含まない炭酸カルシウム微粒子の透過型電子顕微鏡像を示す。粒子径20nm程度の無定形の粒子が観測される。

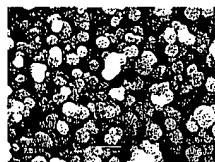
【図5】マグネシウム含有炭酸カルシウムの切断面の透過型電子顕微鏡像を示す。微結晶の集合体であり、中心から放射状に粒子が配向している。

【図6】マグネシウムを含まない炭酸カルシウムの切断面の透過型電子顕微鏡像を示す。微結晶の集合体であり、中心から放射状に粒子が配向している。

【図1】



【図2】



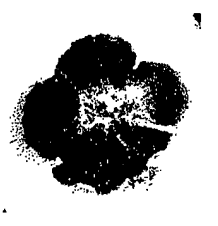
【図3】



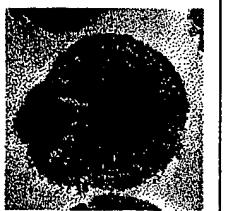
【図4】



【図5】



【図6】



(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/22	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 38/28	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/43	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 K 47/36	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 K 37/43	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 K 37/26	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 K 37/24	

(72)発明者 田中 順三

茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内

(72)発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅丘1-1-11

Fターム(参考) 4C076 AA63 AA64 BB12 BB25 CC04 CC07 CC11 CC21 CC27 CC30  
 CC32 CC34 DD25 DD26 EE30 FF27 FF28 FF31 FF36 FF65  
 GG02 GG16 GG21  
 4C084 AA03 AA13 AA14 AA17 AA27 BA01 BA08 BA23 BA35 BA36  
 BA44 CA62 DA01 DA12 DA19 DA22 DA23 DA24 DB34 DB52  
 DB53 DB54 DB56 DB59 DB62 DC01 DC05 DC21 MA05 MA38  
 MA59 MA66 NA03 NA10 NA12 ZA362 ZB072 ZB112 ZC022 ZC032  
 4C085 AA02 BA01 BB11 CC21 EE01 GG01 GG10  
 4C086 AA01 DA10 MA03 MA05 MA38 MA59 MA66 NA03 NA10 NA12  
 ZA36 ZB07 ZB11 ZC02 ZC03

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**